

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number : **59-033223**

(43) Date of publication of application : **23.02.1984**

(51) Int.CI.

A61K 35/12

// **A61K 35/23**

A61K 35/34

A61K 35/36

A61K 35/37

A61K 35/38

A61K 35/42

(21) Application number : **57-143340**

(71) Applicant : **KOKEN KK**

OISHI TADAKATSU

TAJIMA TOMOYUKI

NAGANUSHI YOUICHIROU

(22) Date of filing :

20.08.1982

(72) Inventor : **TAJIMA TOMOYUKI**

(54) **AGENT FOR SUPPRESSING PROLIFERATION OF MALIGNANT TUMOR CELL OF MAN**

(57) Abstract:

PURPOSE: To prepare the titled suppressing agent having little side effect, by culturing human malignant tumor cell, removing the malignant tumor cells from the culture medium, and extracting the medium.

BEST AVAILABLE COPY

CONSTITUTION: Variety of established cells of cultured cells separated from malignant tumor of man (e.g. established cell HRC originated from human kidney cell carcinoma) are proliferated in a proliferation medium (e.g. BME added with 10% of newborn bovine serum or RPMI1640 added with 5% of newborn bovine serum) in an incubator until the growth of the cell is saturated. The medium is washed once to remove the serum. The product is cultured in an extraction medium (e.g. BME free from serum) at 37°C for 3W4 days, and the medium is collected, and treated with molecular sieves of 10,000, 1,000 and 500. The filtrate is collected to obtain the objective agent for suppressing the proliferation of the human malignant tumor cell.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑩ 日本国特許庁 (JP)

◎特許出願公開

② 公開特許公報 (A)

昭59-33223

⑤Int. Cl.³ 識別記号 厅内整理番号 ⑥公開 昭和59年(1984)2月23日
 A 61 K 35/12 ADU 7138-4C
 // A 61 K 35/23 35/34 35/36 35/37 35/38 35/42 7138-4C 7138-4C 7138-4C 7138-4C 7138-4C 7138-4C 発明の数 1
 7138-4C 7138-4C 7138-4C 7138-4C 7138-4C 7138-4C 審査請求 未請求
 (全 12 頁)

④人の悪性腫瘍細胞増殖抑制剤

⑦出 瞬 人 大石忠勝
京都市伏見区中島秋ノ山町55-

◎卷五 圖 號57-143340

◎出 醫 6257(1982)8月20日

◎出 輯 人 田景知行

◎發明者田島知行

市川市八幡

市川市八幡 6

⑪出願人 長主陽一朗

⑦出願人 興研株式会社

大和市中央3丁目

東京都千代田区四番町 7 番地

明 楠

1. 細胞の種類

八、功能性抗凝血药

2. 特許請求の範囲

人の悪性腫瘍細胞の培養培養地より前記悪性腫瘍を除いて摘出したものからなることを特徴とする人の悪性腫瘍細胞抑制剤。

3. 発明の詳細な説明

この発明は人の悪性腫瘍細胞増殖抑制剤に関する。

この発明は人の癌細胞細胞を増殖し、その培養液より前記悪性腫瘍細胞を除いて抽出したもので、人の膀胱細胞に対し、増殖抑制や癌細胞死効果を特異的に有するものである。この悪性腫瘍細胞増殖抑制物質は、低分子の物質であり、分子量 100 の分子を筋に分けるアミコン社製の Y

に対する増殖抑制力とは著しい差異があり、正常細胞に對して致死効果が認められないことから、この発明により創られた悪性腫瘍細胞増殖抑制剤は、在来の抗腫瘍剤のような副作用はほとんどないと考えられます。

また、人の悪性細胞に人の正常細胞を混合培養してもその培養母地より逸出したものが同様の効果が得られる。そして、混合培養後の母地と新鮮通常培地との比率を調べれば、正常細胞は増殖し、悪性細胞細胞の増殖は著しく低下することができる。

次に、この発明の効果を確認するために実験方法について述べる。

文 駿 1

1) 黄鐵材料とした場合

人の悪性腫瘍より分離した多種類の癌細胞株

樹立株細胞HMSの5種類を使用した。

2) 培 养

成長用培地には10%牛新生児血清を添加した Basal Medium Eagle (BME) および5%牛新生児血清を添加した RPMI 1640 を成長用培地 (growth medium) として用い、抽出用の培养としては、血清無添加の BME を使用した。

まず成長用培地を用い、培養器に胞和状態になるまで懸浮細胞を繁殖し、その後1回洗って細胞を除く。次に、これを抽出用培地にてそのまま3~4日 (図3-7) にて培養するが、または通常の継代培养の如く、前記増殖細胞のうちから既知の細胞数を新たに抽出用培地に播き育して3~4日間 (図3-7) にて培養し、その培地を採取する。

3) 部分培養

収穫した培地を10000, 1000, 500の分子篩にかけ、細胞液を採取する。

4) 悪性細胞細胞増殖抑制剤の検定法

検定に使用した細胞は実験材料に用いた5種類の細胞群、および6才の正常人男子前胸部皮膚

グルコース、アミノ酸、ビタミン、血清10%を添加した培地を用い、対照群は新鮮培地BMEに実験群と同様の栄養液を添加したものを利用した。細胞の初期濃度は 1×10^4 cells とし、第1図の実験では35mmの培養皿を、第2図~第5図の実験では15mmの培養皿を用いた。

第1図の実験はヒト骨髄細胞山来樹立株細胞HRCの経日的变化を調べたもので、対照群の細胞は増殖しているのに比べ、ヒト骨髄細胞山来樹立株細胞HRCの培養後培養地より抽出した物質を含む実験群は、細胞が抑制されていることが明らかに示されている。

第2図Aは正常ヒト2筋膜皮膚細胞芽細胞NA-S63の経日的变化を、第2図Bはヒト骨髄由来樹立株細胞MKの経日的变化を調べたもので、いずれも実験群にはヒト骨髄由来樹立株細胞MKの培養後培養地より抽出した物質を含む実験群の細胞は減少し、致死効果が認められる。

招開昭59-33223(2)

より収穫した正常ヒト2筋膜皮膚細胞芽細胞NA-S63を用い、その増殖状況を成長曲線および強度反応曲線に表わして調べた。

a. 成長曲線

既知の細胞数を培養器に播き、細胞数のみの抽出用培地にBME培地と商薬液、同量のグルコース、アミノ酸、ビタミンを加え、さらに新鮮な前述の血清を10%添加したものを作成用培地として用い、毎日的に細胞数を観察するか、または一定時間培養した後、細胞数を調べる。

b. 強度反応曲線

培養後培地および新鮮培地を各種割合で混合し、成長曲線と同様に各種栄養を加えて一定時間培養した後、細胞数を調べる。

5) 実験結果

第1図~第5図は各種細胞の培養後培地における細胞増殖の経日的变化を成長曲線に表わしたものである。いずれの実験においても、実験群は各悪性細胞細胞増殖抑制剤の培養後培地をアミコン YM5 (M, W, 10³) で限界濃度、栄養液として

第3図は、ヒト肺癌由来樹立株細胞PC-1の経日的变化を調べたもので、ヒト肺癌由来樹立株細胞PC-1の培養後培地より抽出した物質を含む実験群の細胞は減少し、致死効果が認められる。

第4図は、ヒト口腔癌由来樹立株細胞KBの経日的变化を調べたもので、ヒト口腔癌由来樹立株細胞KBの培養後培地より抽出した物質を含む実験群の細胞は、一時増加するが、やがて減少する。

第5図は、ヒト肺癌由来細胞HMSの経日的变化を調べたもので、ヒト肺癌由来細胞HMSの培養後培地より抽出した物質を含む実験群の細胞は減少し、致死効果が認められる。

第6図、第7図は、ヒト骨髄細胞由来樹立株細胞HRCの培養後培地と新鮮培地の各種混合比における調査反応を調べたもので、第6図はヒト骨

特開昭53- 33223 (3)

原であるアミコン製YM2により捕獲したものを使用し、百分比は培養基底地と新鮮基底との組にして培養基底の含まれる割合を示している。これらの図より、培養基底地は正常細胞にも細胞抑制反応を示すが過性細胞の一例であるヒト腎細胞癌由来樹立株細胞HRCには増殖抑制効果がより強く認められる。

表1は、膜外疎通法による各分子量の分級(fraction)の細胞抑制の効果を比較したもので、正常ヒト2倍体皮膚細胞NASC63と、ヒト腎細胞癌由来樹立株細胞HRCを用いている。

表中①、②、③はグルーピングの番号を示し、①、②の分子量(M.W.) 10^6 以下の分級に特異的にヒト腎細胞癌由来樹立株細胞HRCに対して増殖抑制および致死効果を持つものが存在する。ただし、この分級は正常細胞へも影響を与えるが、形態的観察では正常細胞に対する致死効果は認められない。

MFを用い、4時間37℃にて培養後、培地を採取する。

3) 透析、離心

採取した培地をヴィスキングテープ(セロファンでできたチューブで通常の透析に用いるもの)に詰め、外部をポリエチレン・クリカールにて包みし、水分を抽出して濃縮する。その後、10%MgSO₄をトリウム添加型イオンにて透析を行う。

4) 細胞増殖抑制剤の検定法

検定に用いる細胞は、ヒト腎細胞癌由来樹立株細胞HRC及び人の口腔成瘤より樹立したヒト口腔成瘤由来樹立株細胞KBを用いた。採取した培地及び透析した培地をシャーレ内の10%血清添加新鮮培地に添加したものを用い、ヒト腎細胞癌由来樹立株細胞HRC及びヒト口腔成瘤由来樹立株細胞KBの2種の癌細胞及び正常ヒト腎細胞

実験2

1) 實験材料とした細胞

53才、及び63才の正常人の男子前腕部皮膚より採取した正常ヒト2倍体皮膚細胞胚芽細胞、及びヒト腎細胞癌由来樹立株細胞HRCを用いた。

2) 培養

培地には、10%牛新生児血清を添加したBasal Medium, Eagle(BME)を用いた。培養条件は、閉鎖系または5%CO₂, 100%湿度の大気中で行なう間接法を用い、37℃で培養した。

混合培養は、上記培地で、まず、人の細胞胚芽細胞を培養する。培養器に細胞が一箇所なく生えた状態になったとき、ヒト腎細胞癌由来樹立株細胞HRCを 10^7 ~ 2×10^7 個播種する。なお、このとき用いる培養皿は、造形Roux皿(ルーピン)といわれるものを使用する。そして、混合培養時には前記Roux皿から前記10%牛新生児血清を吸引し、新しく使用する培地は、前述の10%牛新生児血清添加、または血清無添加のB

%新鮮血清添加通常培地、正常細胞培養後に10%血清を添加した培地、ヒト腎細胞癌由来樹立株細胞培養後の培地及び混合培養培地の各種条件の培地を使用し、ヒト腎細胞癌由来樹立株細胞HRCを播種した時の日数に対する細胞数を示す増殖曲線で、混合培養後透析で培養したときのみ、細胞増殖抑制及び破壊が認められる。

第9図は、第1図と同様な各種類の培地を使用し、正常ヒト細胞胚芽細胞を培養したもので、混合培養培地においても日数に対する細胞数は増殖傾向を示す。

第10図は、混合培養を血清添加培地で行ない、その培地に10%新鮮血清を添加したものと10%血清添加通常培地とHRC培養後の山形瓶添加培地とにヒト腎細胞癌由来樹立株細胞HRCを培養したもので、この結果より細胞増殖培地にて混合培養を行なへてお断りの結果が得られた。

る。

第 11 図は、混合培養後地と 10% 血清添加新鮮通常培地との和に対する混合培養後地の各種の初期比率による配合を行なったときのヒト骨髄細胞前駆細胞、及びヒト骨髄細胞由来樹立株細胞 HRC の増殖度を示したものである。正常細胞は一部比率では正常培養地より高い増殖度を示し、癌細胞は対数的に増殖度が低下する。

第 12 図は、第 4 図と同じ培地または HRC 培養後地と 10% 血清添加通常培地に対する混合培養後地または HRC 培養後地ににおける他の癌細胞であるヒト口腔底癌由来樹立株細胞 KB の増殖度を示したもので、混合培養後地の方がその生存比率が高くなるほど抑制度も高くなる。したがって混合培養後地は、癌細胞増殖抑制に寄与しており、この抑制は動物によって惹起されることを表わしている。

第 13 図は、細胞摺過後地にて、混合培養を行なった培養後地を透析したものと 10% 血清添加通常培地と、HRC 培養後地と、10% 血

り、混合培養の癌細胞 HRC と異なった癌細胞 K-562 の接種数をそれぞれ変化させた場合の 5 日間の癌細胞数を横軸に示したものであって、癌細胞が異なるものであっても、第 14 図に示す傾向が見られるなどを示している。

また癌細胞の種類は、BME に限らず、他の細胞を用いてもよい。血清添加も 10% に限らず他の濃度、または無血清でもよく、牛新生児血清の他、成牛の血清、仔牛、牛胎兒、まろは他の動物のものを使用することもできる。さらに、培養は静脈培養やその他の浮遊培養系を用いてもよく、培養器も様々あるので、選択選択することは自由である。

4. 例題の簡単な説明

第 1 図は、各培地におけるヒト骨髄細胞由来樹立株細胞 HRC の増殖を示す図、第 2 図は、各培地における正常ヒト 2 価体皮膚細胞芽細胞 NAS 63 の増殖反応を示す図、第 3 図は、各培地における癌細胞の増殖を示す図、第 4 図は、各培地における正常細胞の増殖を示す図、第 10 図は、無血清培地における癌細胞の増殖を示す図、第 11 図は、混合培養後地と新鮮通常培地との各種混合比率の培地における他の細胞の癌細胞の増殖を示す図、第 13 図は、無血清培地にて混合培养地の接種の

特開昭59- 33223 (4)

前記混合培养地との混合割合に対する 5 日間の HRC の細胞数の変化を調べたもので、混合培养後地細胞を添加した培地に著明な細胞増殖抑制効果が認められた。

なお、人の癌細胞細胞や癌細胞は様々なものがあり、一様類に限らず、同様の効果が認められる。しかし、正常細胞と癌細胞の混合比率により、効果の変化が認められ、上記実験から、正常細胞 700 ~ 1000 万に対し、癌細胞 1000 万 ~ 2000 万を接種するのが好ましいと考えられる。参考のため、第 14 図、第 15 図を添付する。

第 14 図は、10% 血清添加通常培地と混合培養後地との和に対する混合培養後地の割合を横軸にとり、混合倍率の癌細胞 HRC と同様の癌細胞 HRC の接種数をそれぞれ変化させた場合の 5 日間の癌細胞数を縦軸に示したものであって、癌細胞接種数が大きいほど、また、混合培養後地の割合が高いほど癌細胞数が少なくなっている。

第 15 図は、10% 血清添加通常培地と混合培養後地との和に対する混合培養後地の割合を横軸にと

り、混合培養の癌細胞 HRC と異なった癌細胞 K-562 の増殖を示す図、第 5 図は、各培地におけるヒト筋膜性肉腫由来樹立株細胞 LMS の増殖を示す図、第 6 図は、ヒト骨髄細胞由来樹立株細胞 HRC の培養後地と新鮮培地の各種混合比におけるヒト骨髄細胞由来樹立株細胞 HRC の処理反応を示す図、第 7 図は、第 6 図と同様の各培地における正常ヒト 2 価体皮膚細胞芽細胞 NAS 63 の増殖反応を示す図、第 8 図は、各培地における癌細胞の増殖を示す図、第 9 図は、各培地における正常細胞の増殖を示す図、第 10 図は、無血清培地における癌細胞の増殖を示す図、第 11 図は、混合培養後地と新鮮通常培地との各種混合比率の培地における正常細胞及び癌細胞の増殖を示す図、第 12 図は、混合培養後地と新鮮通常培地との各種混合比率の培地における他の細胞の癌細胞の増殖を示す図、第 13 図は、無血清培地にて混合培养地の接種の

特開昭59- 33223 (5)

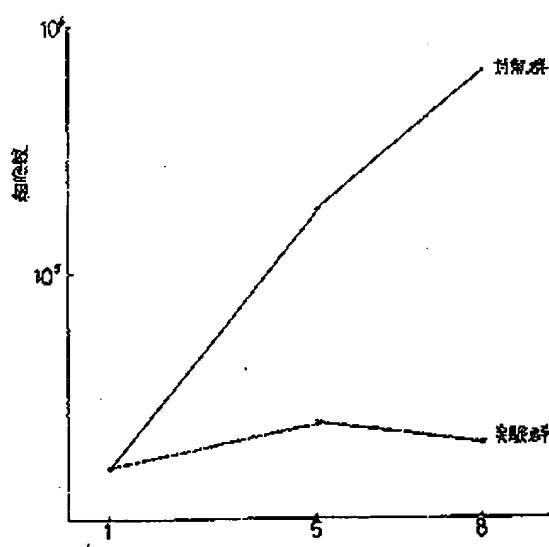
の結果を示す例である。表1は、各分子量分級の細胞増殖の結果を比較したものである。

出願人代理人 弁護士 皆 本 公 司

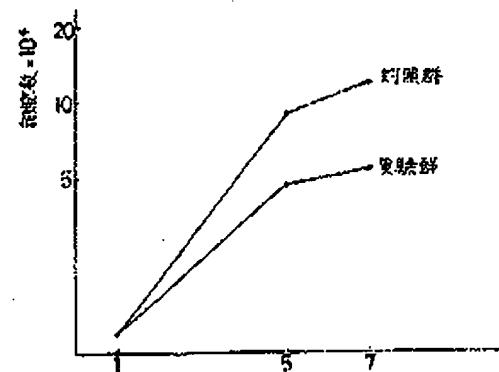
表 1

分 級	NAS 63		MRS	
	細胞数・10 ⁴	%	細胞数・10 ⁴	%
対照群	6.30	100	21.14	100
①≤10 ⁴	1.58	25	0.33	1.6
②≤10 ⁴	1.72	27	0.31	1.5
10 ⁴ ③≤10 ⁵	3.78	60	17.87	85

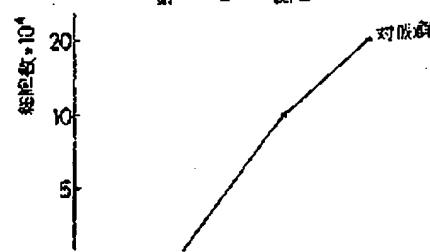
第 1 図



第 2 図 A

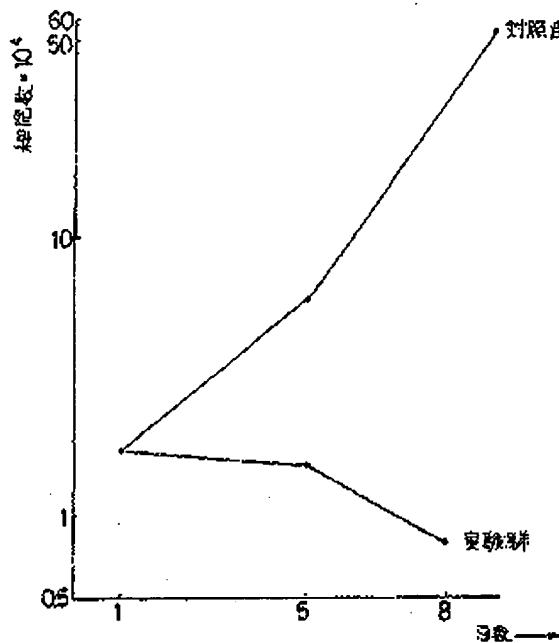


第 2 図 B

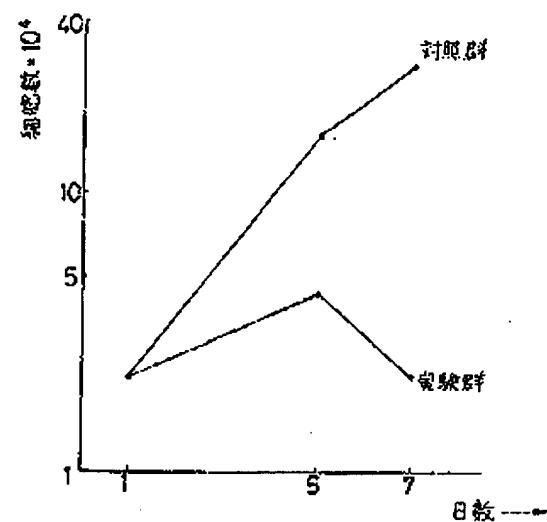


特許昭59-33223(6)

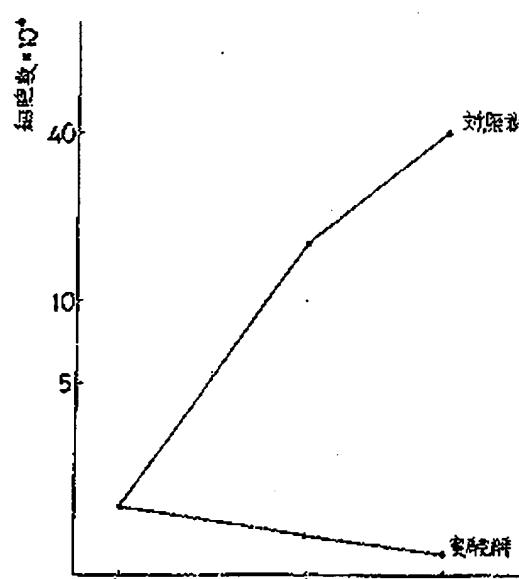
第 3 図



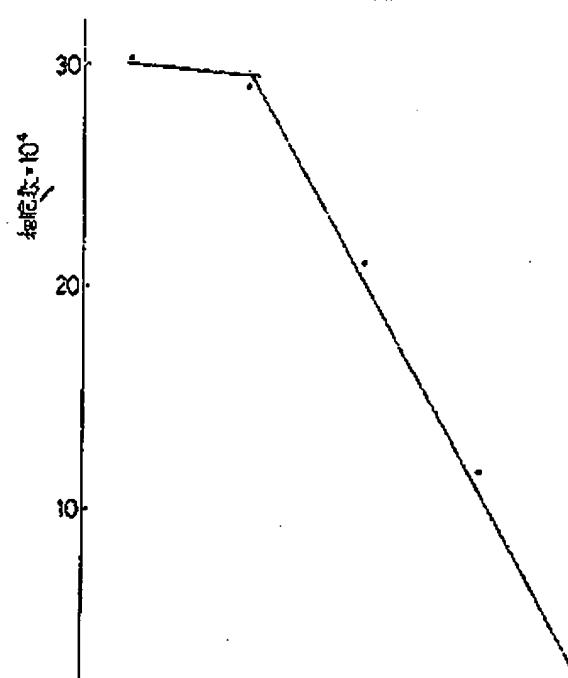
第 4 図



第 5 図

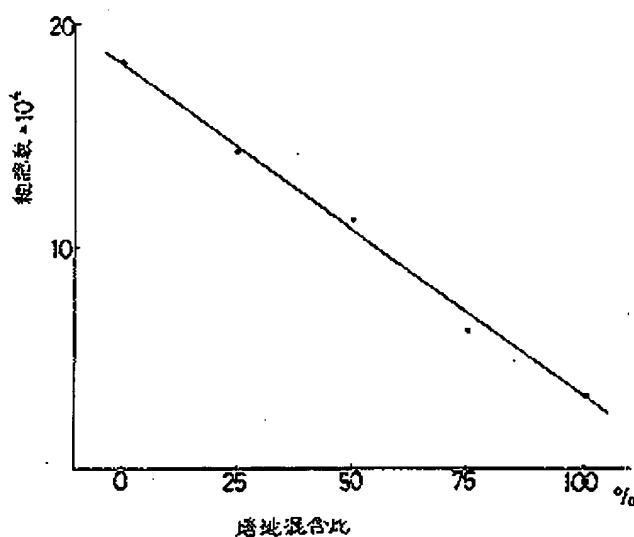


第 6 図

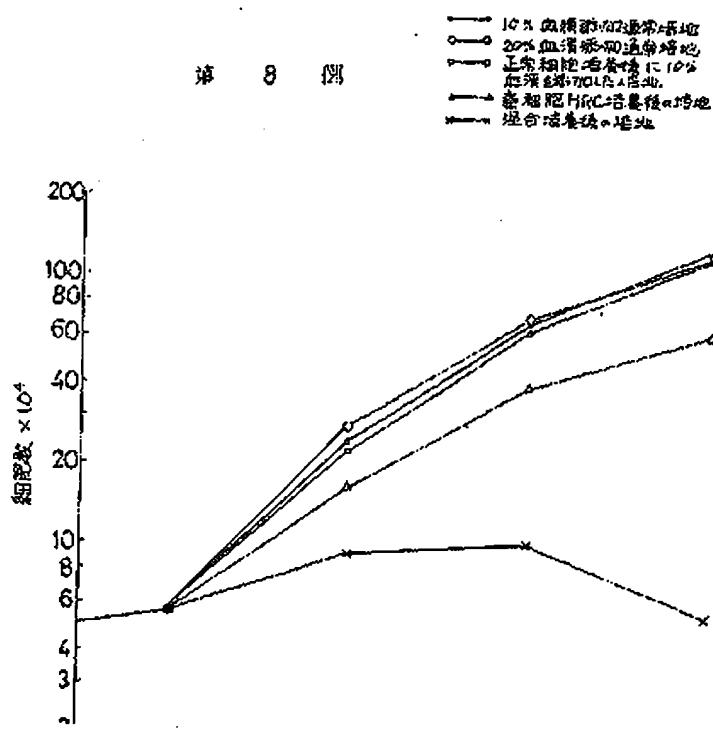


特許昭59- 33223 (7)

第 7 図

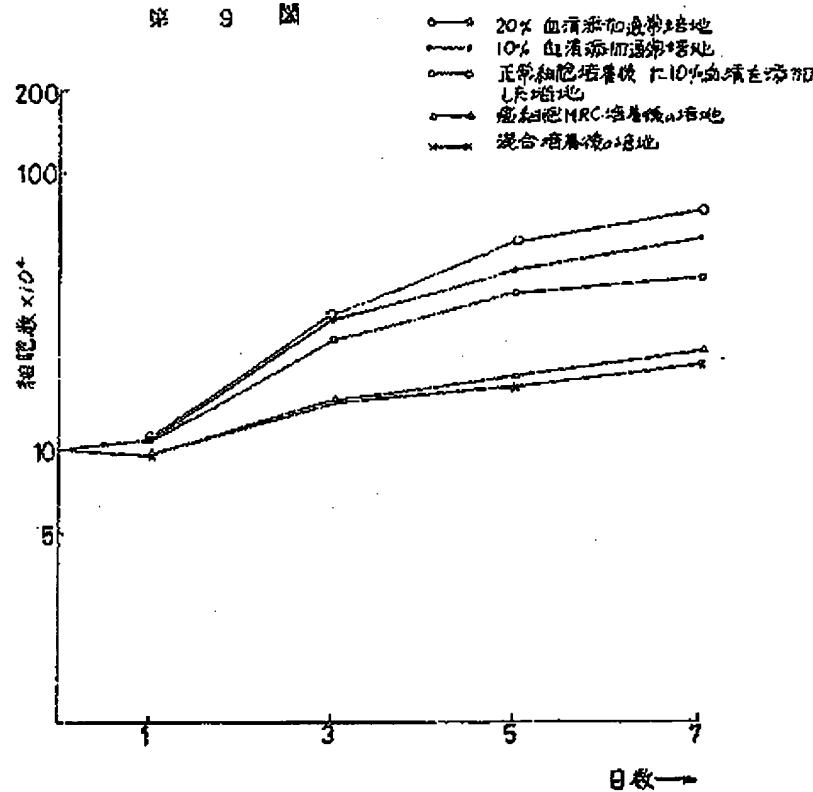


第 8 図

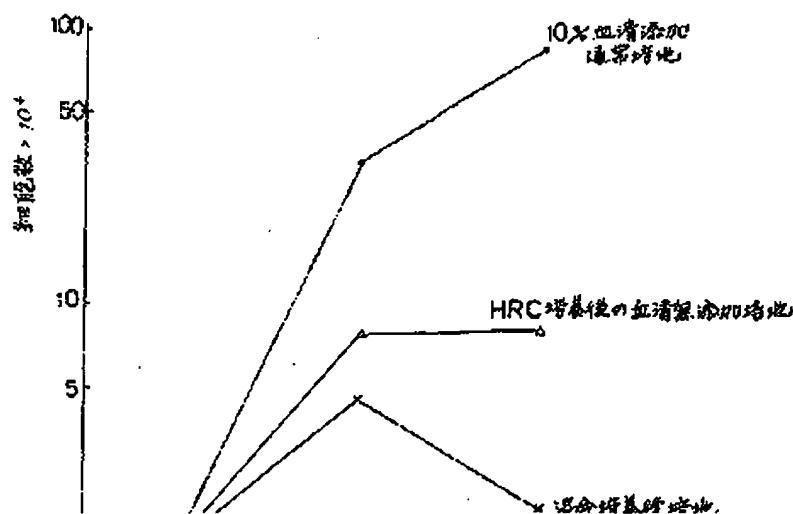


特許昭59- 33223 (8)

第 9 図

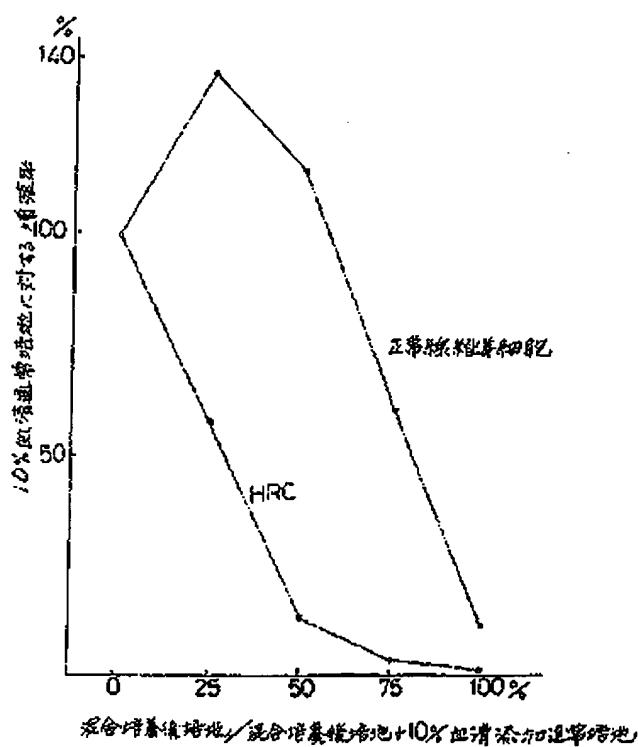


第 10 図

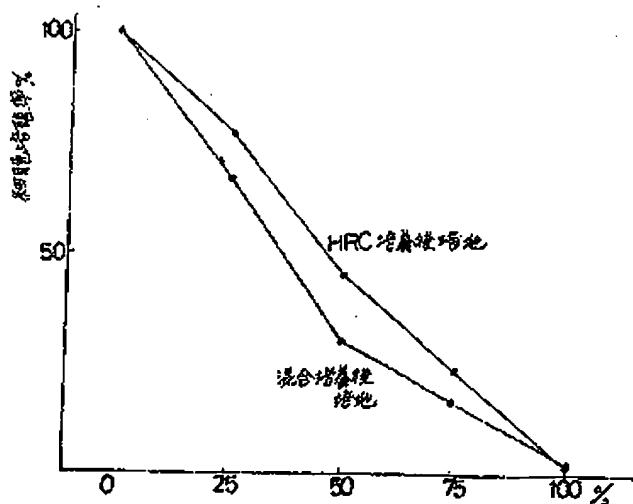


植物物59-33223(9)

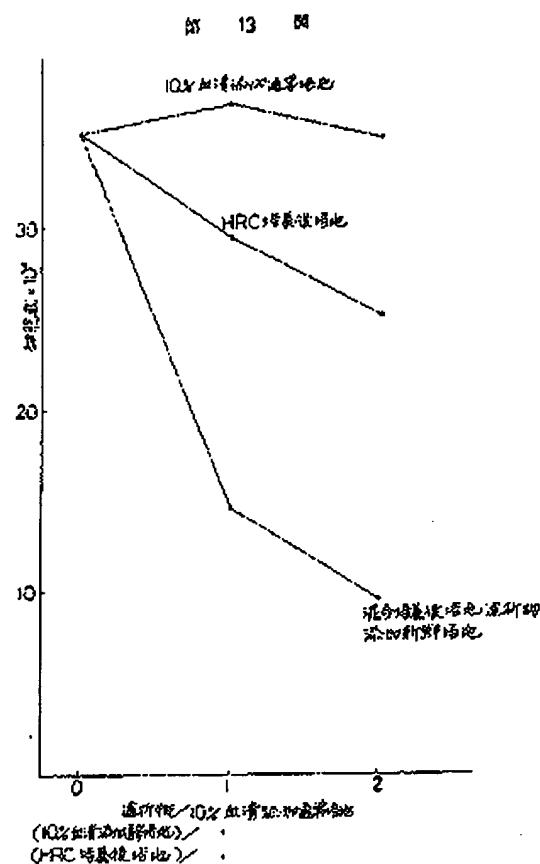
第 11 図



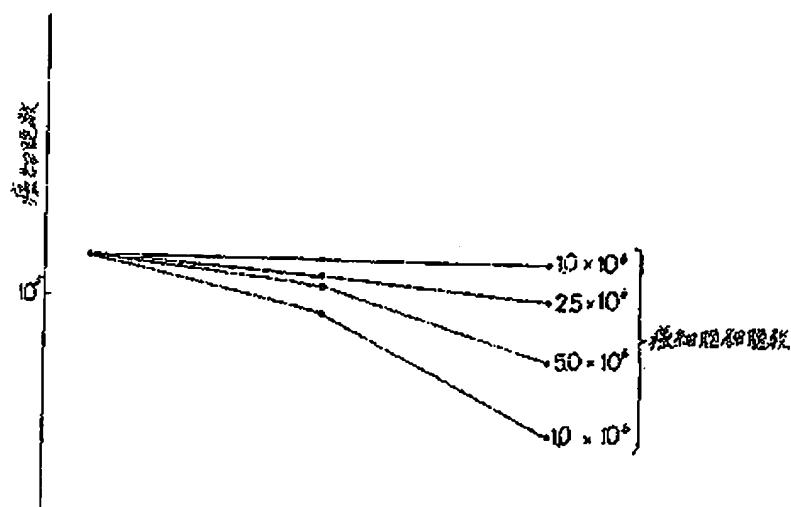
第 12 図



特許第59-33223(10)

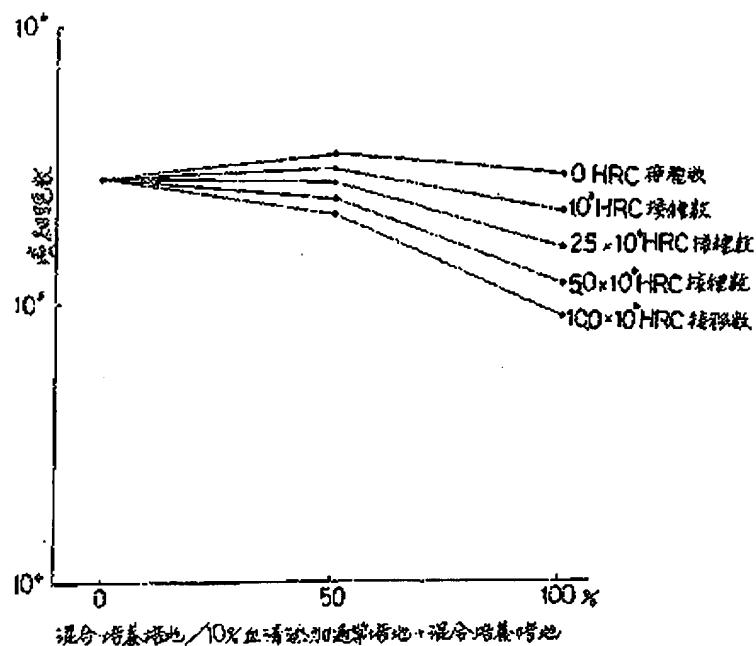


第 14 図



特許第59- 33223 (11)

第 15 図



平 基 準 正 書

昭和57年11月29日

特許庁長官 岩 杉 新 夫 氏

1. 事件の表示

昭和57年特許第143340号

2. 訴明の名稱

人の悲作師編輯部原稿印

3. 無効を主張する者

当事者との関係 特許出願人

住所 東京都千代田区西新橋7番地

名称 株式会社

(注記 3名)

4. 代理人 平 105

住所 東京都港北区ノ門1丁目1番11号虎・ビル5階

氏名 (8230) 分野士 伸 本 一 勝 同上

電話 502-2578

5. 請求項の自体 (6 し (由発明正)

6. 無効の内容

(1) 明細書の特許請求の範囲を別紙のとおり補正する。

(2) 同上第1頁第12行、第2頁第7行、第8行、

第9行、第3頁第6行、第6～7行、第8行、

第10行、第13行、第14行、第16行、

第4頁第6行(2ヶ所)、第8～9行、第12行

(2ヶ所)、第16行、第19行、第5頁第2行

(2ヶ所)、第17行(2ヶ所)、第6頁第3行、

第7行、第11行、第15行(2ヶ所)、

第7頁第2行(2ヶ所)、第3行、第4行の「然地」

を「培地」と補正する。

(3) 同上第6頁第19行「をを」を「を」に修正す
る。

特許明59- 33223 (12)

特許請求の範囲

手 続 楽 正 願 (方式)

昭和57年12月 3日

人の致死呼吸抑制の妨害後速効止咳薬微粒
塗被膜を含いて抽出したものからなることを特徴
とする人の致死呼吸抑制増強剤。

特許登録名 杉 初 夫

1. 事件の表示

昭和57年 特 許 第 143340 号

2. 発明の名称

人の致死呼吸抑制増強剤

3. 紛正をする者

事件との関係 特約 出願人

住所 東京都千代田区四番町7番地

名称 四国株式会社 (ほか 3名)

4. 代理人 不要

住所 東京港区南アリバ 1丁目 3番11号虎 ビル 6階

氏名 (8230)弁理士 竹本松吉

電話 502-2578

5. 紛正命令の日付

昭和57年11月12日(昭和57年11月3日自発送)。

6. 紛正により削除する発明の数 なし

7. 紛正の対象 明細書の発明の詳細な説明の根、圖面の
簡単な説明の欄並びに圖面中の表1。

八、補正の内容

- (1) 明細書第7頁第16行と第8頁第1行との間に次の
の表を挿入する。

表 1

N A S G 3		T R S		
分類	細胞数×10 ⁴	%	細胞数×10 ⁴	%
対象群	6.36	100	21.11	100
① < 10 ⁴	1.48	23	0.33	1.6
② 5.10 ⁴	1.72	27	0.31	1.5
③ 5.10 ⁴ ≤ 6.0 × 10 ⁴	3.78	60	17.87	81

- (2) 表1を第15頁第1行～第2行(表1は、……も
のである。)を削除する。

- (3) 図面中表1を削除する。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.